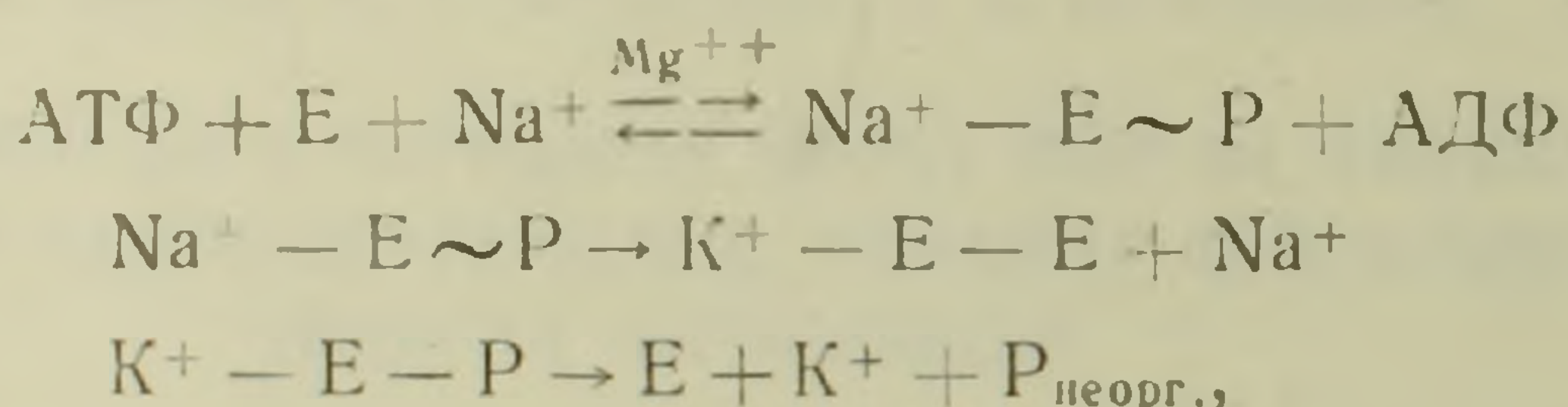


К. Н. ДЖАНДЖУГАЗЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТРАНСПОРТНОЙ $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ АКТИВИРУЕМОЙ АТФ-азы КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН МЕТОДОМ УЗКОПОЛОСНОЙ рН-МЕТРИИ

Свойства ферментной системы, сопрягающей гидролиз АТФ с транспортом одновалентных ионов через клеточные мембраны, исследуются в последнее время чрезвычайно интенсивно в связи с изучением молекулярных механизмов возникновения и поддержания ионной асимметрии живых клеток. Гидролиз АТФ фрагментами клеточных мембран стимулируется добавлением ионов Na^+ и K^+ в присутствии ионов Mg^{++} , угнетается сердечным глюкозидом оуабатином и протекает по крайней мере в 3 стадиях [4]:



где $\text{Е} - \text{Na}^+ + \text{K}^+$ — активируемая АТФ-азная ферментная система (NaKA).

Целью настоящей работы было изучение некоторых свойств активируемой ионами Na^+ и K^+ реакции гидролиза АТФ клеточными мембранами.

Материал и методы. Фракция цитоплазматических мембран, содержащая активируемую ионами Na^+ и K^+ АТФ-гидролизующую ферментную систему, выделялась из коры почек морской свинки модификацией методов [2, 6, 7] с помощью дифференциального центрифугирования.

Для измерения скорости гидролиза АТФ клеточными мембранами в присутствии активирующих ионов была применена методика узкополосной рН-метрии.

Принцип измерения АТФ-азной активности по изменению рН среды основан на том, что в ходе гидролиза АТФ образуется ортофосфорная кислота, диссоциация которой ведет к закислению среды, и скорость изменения рН пропорциональна скорости появления в среде ортофосфата, т. е. характеризует измеряемую АТФ-азную активность.

Метод изучения АТФ-азной реакции по закислению среды был описан в работе Грина и Моммэртса [5], исследовавших АТФ-азную активность актомиозина, и уже нашел довольно широкое применение в этой области исследований.

Применение же метода узкополосной рН-метрии в изучении кинетики NaKA-реакции мембранной фракции связано с рядом трудностей.

Как сказано выше, ферментная система, гидролизует АТФ, вызывает закисление среды, тем самым меняя условия изучаемой реакции, и основным критерием для выбора допустимого диапазона изменения рН в процессе опыта является линейность скорости реакции в данном интервале изменения рН среды.

Естественно, допустимый диапазон изменения рН тем меньше, чем острее рН—зависимость ферментативной активности. С другой стороны, уменьшение допустимого интервала изменения рН ограничивается закислением среды за счет диффузии CO_2 в реакционную ячейку, а также помехами в измерительной цепи.

рН—оптимум транспортной АТФ-азы лежит в более узком интервале рН, чем для актомиозина, и если для последнего допустимый интервал был $\Delta \text{pH} = 0,2-0,3$, то для NaKA приходится работать в интервале $\Delta \text{pH} = 0,1$, что повышает требования к помехоустойчивости системы.

Кроме того, следует учесть, что незначительные изменения концентрации ионов K^{+} в среде вызывают существенные изменения в скорости реакции NaKA, поэтому нельзя работать с обычно применяемым в рН-метрии губчатым электролитическим ключом на 3M KCl, дающим большую течь KCl в реакционную ячейку.

По литературным данным, наиболее пригодны электролитические мосты, заполненные агар-агаром на 1M NaCl [3].

Критериями отбора электролитических мостов служат течь (меньше чем $5 \frac{\text{мМ}}{\text{час}}$), определявшаяся пламеннофотометрически, и сопротивление моста (не более 15 ком).

В установке для узкополосной рН-метрии был применен рН-метр ЛПМ-60 М. Для регистрации изменения ЭДС электродной системы напряжение с выхода ЛПМ-60 М подавалось через компенсационную схему на выход самонизирующего прибора марки «Polalograph LP60». Запись велась на диапазоне $\Delta \text{pH} = 0,1$. Реакционная среда изолировалась от доступа CO_2 крышкой особой конструкции. Вся измерительная часть установки была тщательно экранирована.

Реакционная среда перемешивалась с помощью магнитной мешалки. Для предотвращения влияния перемешивания на ЭДС электродной системы [3] применялись мешалки одинакового размера и использовалась одна скорость перемешивания.

Поскольку NaKA представляет собой дополнительную активность, выявляемую на фоне Mg^{++} —АТФ-азы при добавлении Na^{+} и K^{+} и угнетающуюся оуабайном, в экспериментах записывались 2 кривые:

1) АТФ-азная активность в присутствии 5 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 4 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТФ и мембранной фракции при 37°C —суммарная АТФ-азная активность ($V_{\text{общ.}}$).

2) АТФ-азная активность с теми же реагентами, но в присутствии 10^{-4} М оуабайна (или там, где это не приводило к изменению ионной силы от точки к точке на экспериментальной кривой, записывалась та же реакция, но без K^{+} и в присутствии 10^{-5} М оуабайна. Это меняет абсолютные величины, но не влияет на ход кривой).

Эта активность— Mg^{++} -активируемая (V_{Mg}). Разность этих двух активностей и представляет собой искомую NaKA-активность, и поскольку экспериментально определялись $V_{\text{общ.}}$ и V_{Mg} , то V_{NaKA} строилась графически. Среднеквадратичное отклонение не превышает радиуса экспериментальных точек на рисунках.

Скорости приведены в относительных единицах $1 \frac{\text{мм ленты самописца}}{\text{мин}}$. Описанная ме-

тодика измерения АТФ-азной активности обладает рядом преимуществ по сравнению с обычно применяемым определением по фосфору. В средах небольшой буферной емкости этот метод обладает высокой чувствительностью, особенно в области нейтральных и щелочных pH. Он обеспечивает непрерывную запись кинетики АТФ-азной реакции, что позволяет, в частности, выбрать соотношения реагентов, при которых реакция идет по типу реакции первого порядка, и, следовательно, правомерно считать среднюю скорость реакции за данный промежуток времени истинной скоростью АТФ-азной реакции.

Результаты. В данной работе методом узкополосной pH-метрии определены оптимальные условия NaKA-активности.

Рис. 1 иллюстрирует pH-зависимость исследуемой ферментативной активности. Как видно из разностной кривой для NaKA, pH-оптимум этой активности наблюдается при pH 7,3.

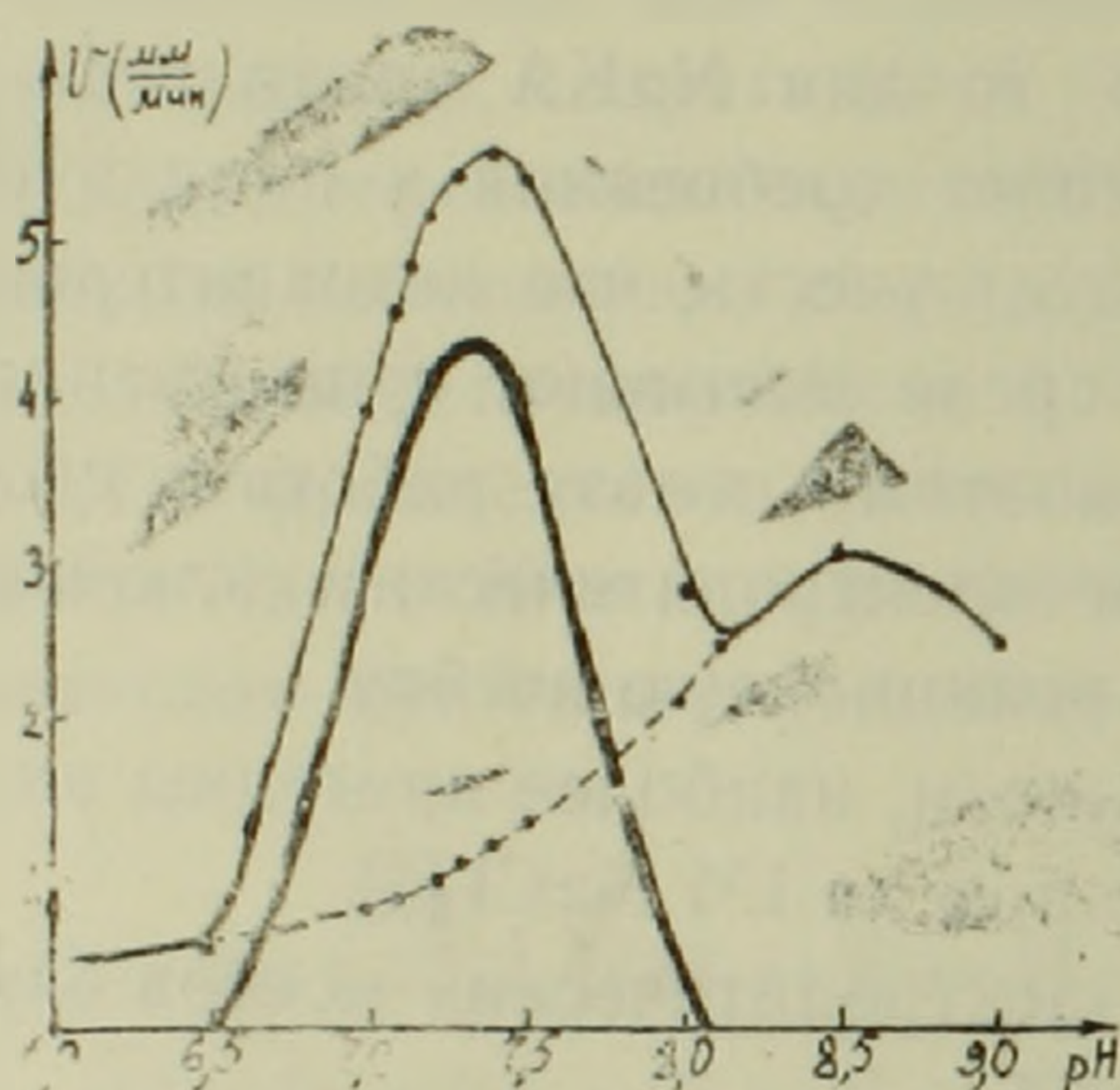


Рис. 1. Зависимость АТФ-азной активности от pH среды. Сплошная линия — $V_{\text{общ}}$; пунктирная — V_{Mg} ; толстая — V_{NaKA} .

Зависимость NaKA-активности от соотношения активирующих ионов Na^+ и K^+ показана на рис. 2. Для исключения действия изменений ионной силы на активность ферментной системы сумма концентраций Na^+ и K^+ поддерживалась постоянной и была выбрана на основании литературных данных [2].

Небольшие концентрации K^+ резко активируют NaKA-активность, оптимум наблюдается при $[\text{K}^+] = 5 \text{ мМ}$ и $[\text{Na}^+] = 25 \text{ мМ}$. Дальнейшее увеличение концентрации K^+ несколько снижает активность ферментной системы.

Большой интерес представляет изучение кинетики действия специфического ингибитора NaKA оуабайна на ферментативную активность мембранной фракции, поскольку применение для этих целей методики определения неорганического фосфора затрудняет «инертность» этого метода. На рис. 3 представлена кинетика взаимодействия оуабайна с NaKA ферментной системой. Как видно из значений скорости реакции и кривой, изображающей процент ингибированной активности от максимального торможения АТФ-азной реакции, максимальное угнетение NaKA-

активности достигается после 15 мин взаимодействия ингибитора с ферментной системой.

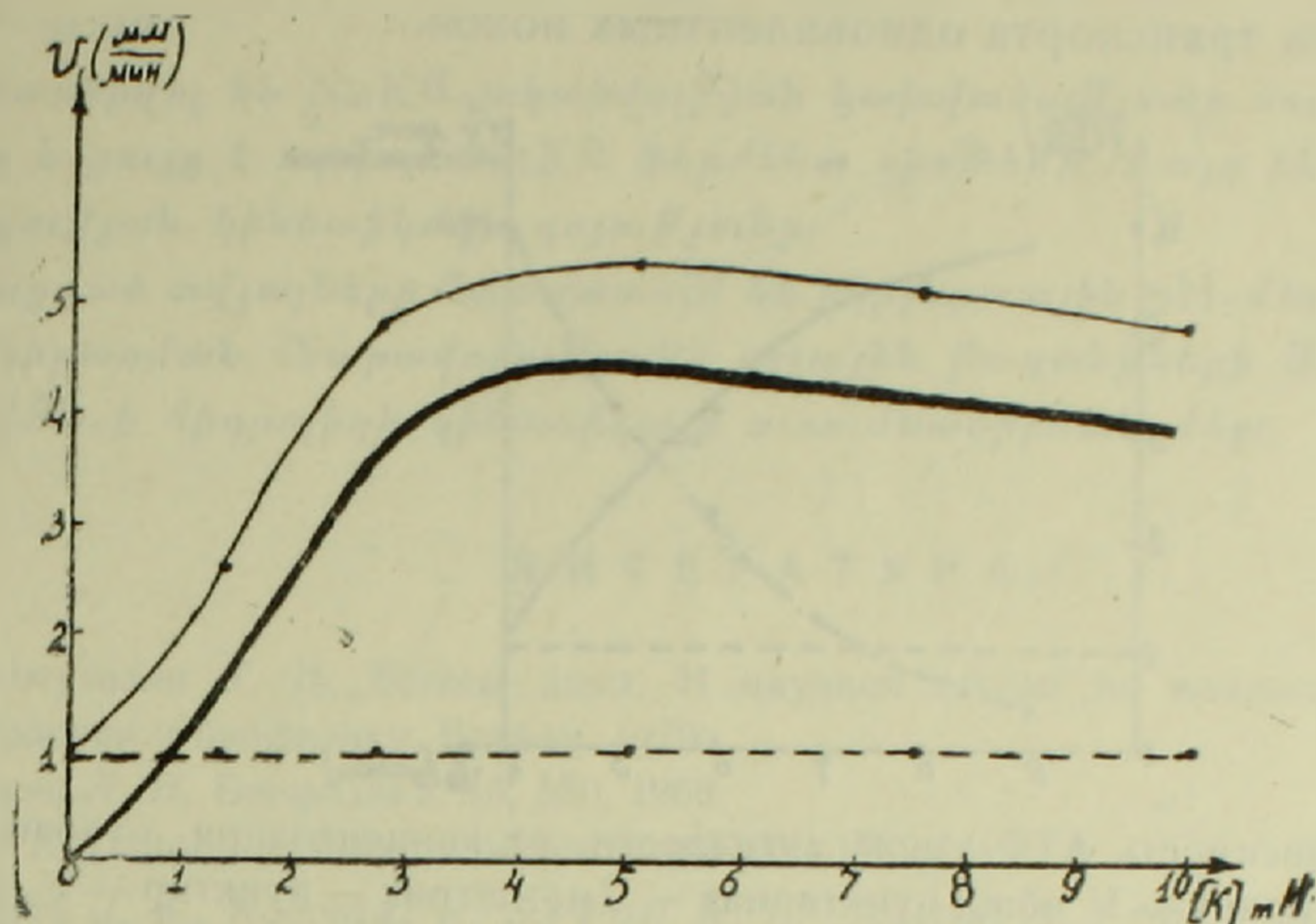


Рис. 2. Зависимость АТФ-азной активности от соотношения Na^+ и K^+ . Сплошная линия — $V_{\text{общ}}$; пунктирная — V_{Mg} ; толстая — V_{NaKA} .

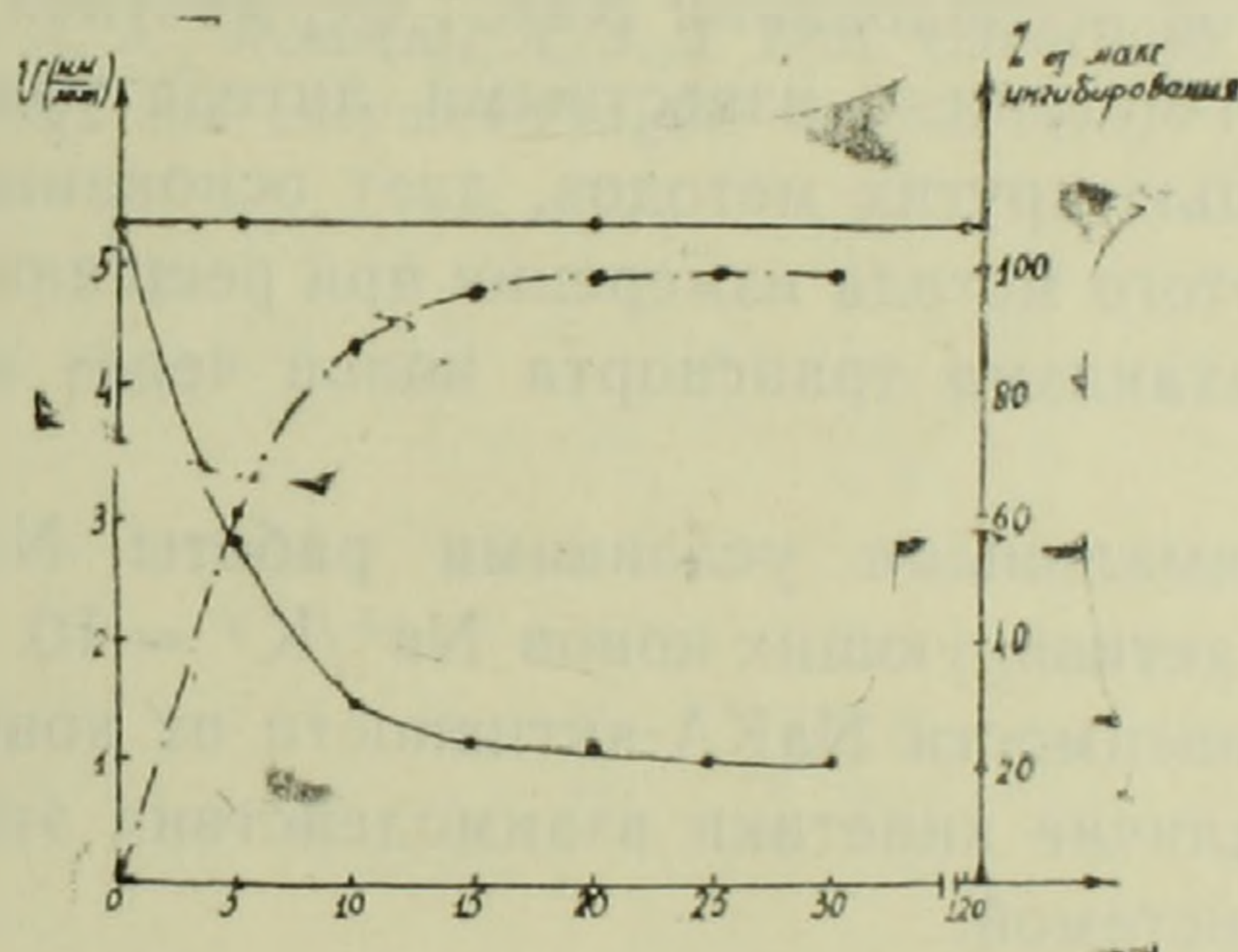


Рис. 3. Кинетика действия оубаина на АТФ-азную активность. Сплошная линия — АТФ-азная активность: 1 — без оубаина, 2 — в момент $t=0$ добавлен оубаин 10^{-4} М. Штрих — пунктир — % ингибированной активности от максимального ингибирования.

Изучалась зависимость АТФ-азной активности от концентрации оубаина от 10^{-9} М до 10^{-4} М (рис. 4). При сравнении общей активности с приведенной Mg^{++} -АТФ-азной полумаксимальное торможение обнаруживается при $-\lg(\text{оубаина}) = 5.9$, т. е. при концентрации ингибитора $1,26 \times 10^{-6}$ М.

Данные, полученные методом узкополосной рН-метрии, хорошо согласуются с известными из литературы [2] характеристиками NaKA ферментной системы, выделенной из того же объекта и изученной другими методами.

Наличие кинетики взаимодействия оубаина с ферментной системой NaKA мембранной фракции также соответствует данным, представленным в работе Репке [8].

Результаты настоящей работы позволяют выбрать оптимальные условия NaKA—АТФ-азной реакции для дальнейшего изучения молекулярного механизма транспорта одновалентных ионов.

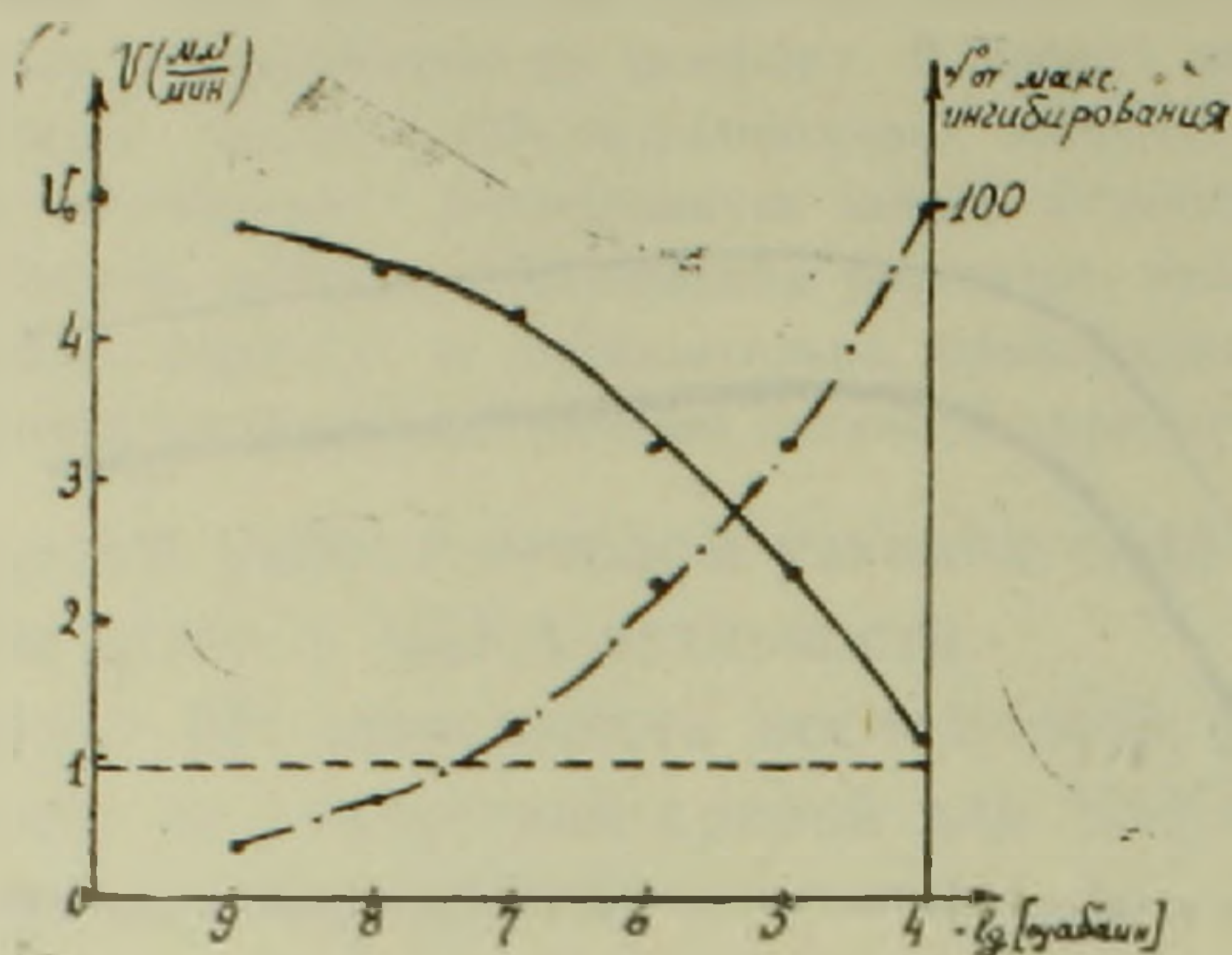


Рис. 4. Зависимость АТФ-азной активности от концентрации оуабайна. Сплошная линия — V общ.; пунктирная — V_{Mg} ; штрих — пунктир — % ингибированной активности от максимального ингибирования. V_0 — без оуабайна.

Совпадение результатов исследования NaKA ферментной системы методом узкополосной рН-метрии с известными литературными данными, полученными с помощью других методов, дает основание надеяться на широкое применение этого метода измерения при решении задач, связанных с выяснением механизма транспорта ионов через клеточные мембраны [1].

Таким образом, оптимальными условиями работы NaKA являются рН 7,3 и соотношение активирующих ионов $Na^+/K^+ = 10$.

При исследовании зависимости NaKA-активности от концентрации оуабайна установлено наличие кинетики взаимодействия этого ингибитора с NaKA ферментной системой.

Сравнение полученных результатов с литературными данными выявляет возможность успешного применения метода узкополосной рН-метрии при исследовании кинетики гидролиза АТФ транспортной АТФ-азой клеточных мембран.

Лаборатория радиационной биофизики
Ереванского физического института

Поступило 9.IX 1971 г.

Կ. Ն. ԶԱՆԶՈՒՂԱԶՅԱՆ

ՏՐԱՆՍՊՈՐՏԱՅԻՆ Na եւ K ԱԿՏԻՎԱՅՎՈՂ ԱՏՖ-ազայի
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ՆԵՂՇԵՐՏԱՅԻՆ pH-ՄԵՏՐԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ա մ փ ո փ ո մ

Նեղշերտային pH-մետրիայի մեթոդով ուսումնասիրվել են ծովախոզուկի
Լրիկամների կեղևի թաղանթային ֆրակցիայի Na^+ և K^+ ակտիվացվող ԱՏՖ-
ազ սիստեմի հատկությունները (NaKA): NaKA սիստեմի աշխատանքի օպ-

տիմալ պայմանները եղել են 7, 3 և ալտիվացնող իոնների հարաբերակցումը $\text{Na}^+/\text{K}^+ = 10$.

Ուսումնասիրվել են NaK -ալտիվության կախվածությունը օուբաինի խրտությունից և ցույց է տրված NaK ֆերմենտ սիստեմի և այդ ինհիբիտորի փոխազդեցության կինետիկայի գոյությունը:

Ստացված տվյալները հաստատում են ներշնչության pH -մետրիայի մեթոդի հաջող կիրառման հնարավորությունը բջջային թաղանթների ԱՏՖ-ազայի միջոցով ԱՏՖ-ի հիդրոլիզի կինետիկայի ուսումնասիրման մեջ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Джанджугазян К. Н. Тезисы докл. II научной сессии по вопросам молекулярной биологии и биофизики, Ереван, 1970.
2. Писарева Л. Н. Биофизика, 13, 550, 1968.
3. Швабе К. Основы техники измерения pH . М., 1962.
4. Charnock J. S., Rosental K. S., Post R. L. „Austral. J. Exptl Biol. and Med. Sci.“ 41, 675, 1963.
5. Green P. K., Mommaers D. C. J. Biol. Chem. 202, 541, 1953.
6. Kinsolving C. R., Post R. L., Beaver D. L. J. Cell Comp. physiol. 62, 85, 1963.
7. Post R. L., Jen A. K., Rosental A. S. J. Biol. Chem. 240, 1437, 1965.]
8. Repke K. In Drugs and enzymes Prague, 65-87, 1965.